

На правах рукописи



Якименко Владислав Андреевич

**Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального
облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Официальные оппоненты:

Карев Вадим Евгеньевич – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, научно-исследовательский отдел патоморфологии, заведующий отделом

Загребин Валерий Леонидович – кандидат медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «19» мая 2025 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лучевой гепатит является одним из осложнений облучения злокачественных новообразований печени или органов брюшной полости, поэтому меры профилактики и лечения острого и хронического радиационно-индуцированного повреждения нуждаются в уточнении [IAEA Safety Standards; Series No. GSR, Part 3, General Safety Requirements; 2015].

В некоторых исследованиях продемонстрировано изменение гистоархитектоники печени при использовании X- или γ -облучения. Воздействие γ -излучения в дозе 30 Гр в 5 – 10 % случаев приводит к поражению всей печени, при увеличении дозы до 43 Гр в 50 % случаев. Эффективной дозой при радиотерапии гепатоцеллюлярного рака считается доза выше 60 Гр, однако она увеличивает риск летальности до 76 % из-за наступления печеночной недостаточности. Однократное X-облучение уже в дозе 8 Гр приводит к морфологическим изменениям печени, таким как: отек, кровоизлияние и застой в синусоидных гемокапиллярах. В тоже время, описано, что однократное общее γ -облучение даже в низкой дозе (4 Гр) вызывало повреждения печени на клеточном и субклеточном уровнях, приводящее к разрывам ДНК и деструкции митохондрий, и как следствие – к апоптозу гепатоцитов [Abdel-Aziz N., Haroun R.A. et al., 2022].

В настоящее время существующие методы профилактики лучевого гепатита не обладают в должной мере радиопротективным свойством на гепатоциты, что нуждается в дальнейших исследованиях в том числе экспериментальных [Yang W., Shao L., Zhu S., et al., 2019]. Большинство антиоксидантов, таких как аминофостин, аскорбиновая кислота, мельдоний, этилметилгидроксипиридина сукцинат активируют восстановительные реакции, мобилизуя маркеры эндогенной защиты, связывают активные формы кислорода как на локальном, так и на организменном уровнях [Campsci I., Brunetti A., et al., 2023]. Однако, ряд авторов не исключает их радиопротекторное действие, направленное не только на подавление оксидативного стресса, но и на репарацию ДНК клеток в условиях радиационно- индуцированного гепатита [Демяшкин Г.А., Якименко В.А., Вадюхин М.А., 2024].

В качестве одного из препаратов, снижающего степень выраженности морфофункциональных изменений структур печени после облучения электронами, можно рассмотреть аскорбиновую кислоту. Ее выбор обусловлен рядом преимуществ - высокой антиоксидантной активностью, большой терапевтической широтой и минимальными побочными эффектами [Парфенов А.А., 2023].

Таким образом, дефицит данных о морфологических и молекулярно-биологических изменениях гепатоцитов и структур печени в условиях раннего и позднего лучевого гепатита, индуцированного воздействием электронами, а также о мобилизации компенсаторно-

приспособительных механизмов введением аскорбиновой кислоты актуализирует проведение данного исследования.

Степень разработанности темы исследования

X и γ излучения обладают высокой степенью цитотоксичности, особенно в отношении здоровых тканей, попадающих в зону облучения при проведении лучевой терапии. Радиационно-индуцированное повреждение печени сопровождается снижением метаболических и детоксикационных функций, вплоть до развития выраженной печеночной недостаточности, приводящие к снижению качества жизни онкологических пациентов.

В тоже время малоизученными остается качественно-количественные изменения структур печени при воздействии бета-облучения, являющегося одним из перспективных методов современной лучевой терапии, ввиду его низкой проникающей способности и обладающие меньшим повреждающим действием на окружающие здоровые ткани [Демяшкин Г.А., Якименко В.А., Вадюхин М.А. и др., 2024]. Поэтому его можно использовать как альтернативу, в том числе при интраоперационном облучении опухолей печени и органов верхнего этажа брюшной полости. До сих пор ведется активный поиск субстратов, которые могли бы предотвращать развитие печеночных осложнений у онкологических пациентов при радиотерапии. Одним из немногих рекомендованных лекарственных препаратов с доказанной эффективностью в отношении лучевых повреждений является амифостин, однако он вызывает ряд побочных действий. Это еще более актуализирует разработку средств-аналогов для радиопротекции печени. Так, аскорбиновая кислота уже была ранее апробирована в некоторых органных моделях в исследованиях *in vivo*. В тоже время отсутствуют комплексные исследования, доказывающие эффективность этого субстрата в печени.

Таким образом, актуально проведение комплексного анализа морфологических и молекулярно-биологических изменений структур печени после воздействия электронами и введения аскорбиновой кислоты: оценки пролиферации, дифференцировки и апоптоза гепатоцитов, степени выраженности воспалительной реакции, активации эндогенной редокс-системы, а также поиск предикторов фиброза.

Цель и задачи исследования

Цель работы – выявление морфофункциональных особенностей структур печени после воздействия электронами и предлучевого введения аскорбиновой кислоты.

Задачи исследования:

1. Провести морфологический и морфометрический анализ печени после фракционного локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр (СОД 30 Гр) и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.
2. Провести биохимический анализ сыворотки крови на содержание

аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы и общего билирубина после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

3. Провести иммуноферментный анализ гомогената печени на уровни малонового диальдегида (MDA) и супероксиддисмутазы (SOD) после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

4. Оценить уровни экспрессии факторов пролиферации (Ki-67) и гибели (caspase 3, TUNEL-методом) гепатоцитов, а также генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

5. Оценить системный и местный уровень концентрации провоспалительных (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

6. Оценить степень фиброза печени в разные временные точки после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

7. Оценить коэкспрессию α -SMA и TGF- β в клетках Ито в качестве маркеров-предикторов раннего радиационно-индуцированного фиброза печени после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

Научная новизна

В рамках исследования определены структурные и функциональные изменения печени после воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, с оценкой этапов жизненного цикла гепатоцитов, системной и локальной воспалительной реакции и степени фиброзирования, а также при предлучевом введении аскорбиновой кислоты, на протяжении трёх месяцев.

Впервые, на основании проведенного морфологического анализа определены степень постлучевых повреждений гепатоцитов, диапазон токсических эффектов, их адаптационная способность после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр, согласно разработанной шкале морфологических изменений печени, которые характеризуются баллонной дистрофией большинства гепатоцитов, фокальной атрофии 1/3 – 2/3 части печеночных долек, частичному некрозу (менее 50% окружности большинства портальных трактов), клеточной воспалительной инфильтрацией 1/3 – 2/3 части портальных трактов, расширению и застойным явлениям в синусоидных гемокапиллярах, преимущественно на

ранних сроках эксперимента.

Впервые показано, что в ответ на локальное облучения печени электронами в СОД 30 Гр происходит повышение уровней интерлейкина-1, интерлейкина-6 и интерлейкина-10 как в системном кровотоке, так и в ткани печени, при этом высокие концентрации цитокинов сохраняются локально в течение длительного периода времени, что приводит к активации фиброза и усилению печеночной недостаточности, проявляющейся повышением уровней аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и общего билирубина. Впервые показано, что локальное воздействие электронами на структуры печени в режиме фракционирования в СОД 30 Гр сопровождается повышением уровня малонового диальдегида и понижением концентрации супероксиддисмутазы, преимущественно на ранних сроках эксперимента. Впервые выявлено уменьшение количества пролиферирующих (Ki-67↓) при одновременном увеличении доли апоптотических (каспаза 3↑) гепатоцитов, сопровождающееся повышением уровней экспрессии генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* на ранних сроках после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр с последующим частичным восстановлением этих параметров к третьему месяцу эксперимента. Впервые доказано, что локальное воздействие электронов в СОД 30 Гр приводит к резкому увеличению количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК, показанное TUNEL-методом в ранний период и полное восстановление TUNEL-сигналинга через два месяца. Впервые показано, что локальное облучение электронами печени в режиме фракционирования (СОД 30 Гр) характеризуется повышением концентрации ключевых участников иммунной реакции – цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α , ИЛ-10) на системном уровне – транзиторно, а на местном – на протяжении всего времени наблюдения. Впервые установлены маркеры-предикторы для раннего выявления в печени отсроченных осложнений лучевой терапии, таких как радиационно-индуцированный фиброз: коэкспрессия α -SMA и TGF- β указывает на активацию механизма фиброобразования. Выявлены функциональные особенности клеток Ито и других непаренхиматозных клеток. Впервые доказаны радиопротективные свойства аскорбиновой кислоты в отношении структур печени, прежде всего – гепатоцитов, обеспечивающее поддержание локального внутрипеченочного гомеостаза (при сравнении с фармакологическими эффектами амифостина) за счет ее антиоксидантной активности, проявляющейся балансом редокс-системы и субнормальных уровней маркеров этапов жизненного цикла гепатоцитов, снижением степени воспалительной реакции и фиброобразования.

Полученные данные открывают новые перспективы в понимании патогенетических

механизмов лучевого гепатита, которые будут способствовать совершенствованию диагностики, подходов к лечению и профилактики данных морфологических изменений.

Теоретическая и практическая значимость работы

Научная ценность и теоретическая значимость настоящей диссертационного исследования проявляется в получении новых и дополнении существующих данных о морфологических и молекулярно-биологических нарушениях структур печени, а также изменения биохимических параметров после фракционного локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр. Воздействие электронами во фракционном режиме СОД 30 Гр приводит к изменению уровней пролиферации и апоптоза гепатоцитов в сторону гибели этих клеток, увеличению TUNEL-позитивных клеток. Влияние электронов сопровождается меньшей площадью поражения структур печени, относительным сохранением морфологического и функционального статуса гепатоцитов на малой площади среза и умеренным увеличением провоспалительных цитокинов в ткани печени. По результатам иммуноферментного, биохимического, гистологического и иммуногистохимического исследований подтверждено радиопротекторное свойство аскорбиновой кислоты, которое проявляется в восстановлении пролиферативно- апоптотического баланса гепатоцитов, снижения степени воспаления и восстановления маркеров естественной антиоксидантной защиты. Коэкспрессию α -SMA и TGF- β в клетках ИТО можно рассматривать в качестве маркеров-предикторов раннего радиационно-индуцированного фиброза печени. По результатам проведенной научно-прикладной работы предложена шкала морфологических изменений печени, которую можно использовать при диагностике гепатитов различной этиологии.

Практический вклад работы отражается в предоставлении новых ценных данных об изменениях в структуре и функциях печени после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр с предварительным интраперитонеальным введением аскорбиновой кислоты, которые могут быть использованы для определения оптимальных доз электронотерапии в области клеточной биологии, патологической анатомии, радиобиологии и онкологии. Эти результаты также могут способствовать разработке методов профилактики постлучевых осложнений органов брюшной полости. Дополнительно, полученные результаты настоящего исследования могут быть использованы в клинических рекомендациях для врачей-патологоанатомов, врачей-радиотерапевтов, онкологов и врачей других смежных специальностей.

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлены структурные и функциональные изменения структур печени, раскрыты механизмы регуляции локального внутрипеченочного гомеостаза в условиях радиационно-индуцированного поражения, вызванного воздействием локального облучения электронами в

режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр и влияния аскорбиновой кислоты.

Методология и методы исследования

В ходе работы использовались биохимический, иммуноферментный, молекулярно-генетический, гистологический, морфометрический, гистохимический, иммуногистохимический, иммунофлуоресцентный и статистический методы анализа. Работу проводили на экспериментальных животных – крысах породы Вистар (n=180), которых локально облучали электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр и вводили аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг/кг (препарат сравнения – амифостин в дозе 150 мг/кг) перед каждой фракцией.

Положения, выносимые на защиту

1. Локальное облучение электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр приводит к развитию радиационно-индуцированного поражения печени (баллонная дистрофия гепатоцитов, фокальная атрофия и некроз печеночных долек, воспалительная реакция, расширение и застой в синусоидных гемокапиллярах) вплоть до печеночной недостаточности. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает степень выраженности воздействия электронами на структуры печени.

2. Локальное воздействие электронами на печень в режиме фракционирования в суммарной дозе 30 Гр характеризуется угнетением эндогенной редокс-системы (дисбаланс MDA и SOD) и фрагментацией ДНК (установлено TUNEL-методом) с нарушением регуляции жизненного цикла гепатоцитов (каспаза-3↑, *Bax*↑, *Bcl-2*↑, Ki-67↓). Напротив, аскорбиновая кислота активирует маркеры эндогенной антиоксидантной системы и снижает степень повреждения ДНК, поддерживая пролиферативно-апоптотический баланс.

3. Локальное облучение печени электронами индуцирует как системное, так и местное повышение концентрации цитокинов ИЛ-1b, ИЛ-6, TNF-α, ИЛ-10, при этом, последнее сохраняется в течение длительного времени, усиливает коэкспрессию α-SMA и TGF-β, приводящей к радиационно-индуцированного фиброзу печени. Антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты нивелируют воспалительные и фибротические процессы, обусловленные воздействием β-излучения.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой из животных – самцов крыс аутбредного стока породы Вистар (вес 220±20 грамм; возраст 9–10 недель; n=180). В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные

статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну. Полученные в результате подсчёта данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows (IBM Analytics, США). Данные выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка (SD). Для оценки 14 нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. При сравнении исследуемых групп при распределении, отличном от нормального, применяли критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Парные сравнения проводили при помощи U-теста Манна-Уитни. Значение $p \leq 0,05$ считали статистически значимым. Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации. Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на: VII Международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради жизни» (г. Москва, 2024 г.); XVIII Международной научнопрактической конференции молодых ученых-медиков «СОБА-2024» (г. Иваново, 2024 г.). Апробация работы состоялась 29 октября 2024 (протокол №12) на заседании межкафедральной конференции Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил все этапы диссертационного исследования: постановка цели и задач, подбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, включая новизну полученных результатов. Также им собственноручно произведен отбор и проанализирована научная литература в сфере выбранной темы, разработан дизайн исследования, сформирована база данных и цифровой архив изображений, выполнена обработка полученных данных с использованием современных методов клеточной биологии. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял гистологическое, морфометрическое, гистохимическое (трихромом по Массону), иммуногистохимическое (на маркеры Ki67, Caspase 3, TUNEL-метод) исследования, мультиплексную иммунофлуоресцентную микроскопию (на Alpha-Smooth Muscle Actin, TGF-beta), иммуноферментный анализ (на малоновый диальдегид, супероксиддисмутазу, ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF- α), проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения

(использования) новой технологии б/н от 11.09.2024 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки/научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Акт о внедрении №494 от 11.09.2024 г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, а также областям исследования согласно пунктам 10, 13, 14 отрасли медицинских наук.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 4 научных статьи в изданиях из RSCI и в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана объемом 131 страница машинописного текста, построена по традиционному плану – состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов с последующим их обсуждением, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Таблиц – 6, рисунков – 42. Характеристика списка литературы: всего – 179 источников, отечественных – 20, зарубежных – 159.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационное исследование выполняли в лаборатории гистологии и иммуногистохимии Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) и лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Дизайн исследования. Самцы крыс породы Вистар (Rattus Wistar; n=180) в возрасте 9 – 10 недель, весом 220±20 грамм были поделены на группы: I группа (n=20) – контрольная; животным интраперитонеально вводили 0,9 % раствор NaCl; II группа (n=40) – опытная; животных локально облучали электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в фракциях по 5 Гр); III группа (n=40) – опытная; животным за 1 час до каждой фракции интраперитонеально вводили аскорбиновую кислоту (АК) в дозе 50 мг/кг, локальное облучение электронами проводили в фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в

фракциях по 5 Гр); IV группа (n=40) – опытная; животным за 30 минут до каждой фракции интраперитонеально вводили амифостин в дозе 150 мг/кг, локальное облучение электронами проводили в фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в фракциях по 5 Гр); V группа (n=20) – опытная; животным интраперитонеально вводили аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг/кг; VI группа (n=20) – животным за 30 минут до каждой фракции интраперитонеально вводили амифостин в дозе 150 мг/кг. Исходя из дизайна эксперимента и установленных правил по проведению доклинических исследований, сроки умерщвления составили: по 5 животных из групп контроля (I), аскорбиновой кислоты (V) и Амифостина (VI) на 7-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки; по 10 животных из групп облучения электронами в дозе 30 Гр (II), предлучевого введения аскорбиновой кислоты (III) и предлучевого введения Амифостина (IV) на 7-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки. При этом в раннем периоде (7 сутки и 1 месяц) проводили оценку острых эффектов воздействия электронами и эффективности радиопротекторов, на 2 и 3 месяцы исследовали отсроченные эффекты (поздние). Выведение животных из эксперимента проводили путем введения (интраперитонеально) высоких доз комбинации анестетиков.

Методы исследования. В настоящей работе на молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях проведен комплексный анализ проявлений радиационно-индуцированной болезни печени и способов их коррекции введением радиопротекторных субстратов – Амифостина и аскорбиновой кислоты. Для этой цели были использованы следующие методы: а) Биохимический и иммуноферментный анализ крови – АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза и общий билирубин, а также на ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF- α ; б) Иммуноферментный анализ гомогената печени на маркеры редокс-системы и воспалительной реакции – на уровне малонового диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD), анализ на содержание цитокинов – ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10; в) Молекулярно-генетический – экспрессия генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3*; г) Гистологический (окраска гематоксилином и эозином); д) Морфометрический (средний диаметр гепатоцита, в мкм, средний диаметр центральной вены, в мкм, количество клеток Купфера, в 1 мм²; значения переводили в относительные баллы от 0 до 5); е) Гистохимический (окраска трихромом по Массону); ж) Иммуногистохимический (с оценкой маркеров жизненного цикла – Ki67, Caspase 3); з) Иммунофлуоресцентный – фрагментации ДНК и гибели клеток (Tunel- метод); и) Мультиплексная иммунофлуоресцентная микроскопия (Alpha-Smooth Muscle Actin, TGF-beta 1). Количество иммунопозитивных клеток подсчитывали в 10 случайных полях зрения светового микроскопа Leica DM2000 с микрофотосъемкой, при увеличении $\times 400$ (в %); й) Статистический.

В течение всего эксперимента животных взвешивали, оценивали поведенческие реакции, состояние слизистых оболочек и кожи, измеряли базальную температуру тела. Отсроченные эффекты воздействия электронами оценивали макроскопически при помощи общепринятой шкалы оценки поздних осложнений облучения (RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme). Затем, обнаруженные изменения при лучевом повреждении переводили в баллы,

ранжируя экспериментальных животных по степени повреждения (от 1 до 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Макроскопическая оценка

Макроскопический анализ печени на третьем месяце эксперимента проводили в соответствии с установленной схемой оценки постлучевых осложнений (RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme). Воздействие электронами в суммарной дозе 30 Гр в большинстве случаев (60 %) привело к развитию частичной рвоты, слабости и признаков диспепсии умеренной степени выраженности, а также к потере веса, в связи с чем животным было выставлено 2 балла по RTOG/EORTC. В большинстве случаев в группах введения аскорбиновой кислоты (70 %) и амифостина (65 %) перед облучением электронами в суммарной дозе 30 Гр преобладала оценка в 1 балл по RTOG/EORTC, что связано с незначительной потерей веса без признаков диспепсии. Результаты оценки групп V и VI не отличались от таковых в контроле (0 баллов по RTOG/EORTC) (Таблица 1). Следует отметить, что в течение всего эксперимента ни одно животное не погибло (4 балла по RTOG/EORTC), а также не отмечали развития признаков тяжелой печеночной недостаточности (3 балла по RTOG/EORTC).

Таблица 1 – Визуальная оценка печени животных в соответствии с балльной шкалой RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme

Группа	n	RTOG/EORTC	
		балл	%
Контроль	20	0	100 %
СОД 30 Гр	40	1–2	1 балл – 40 %; 2 балла – 60 %
СОД 30 Гр + АК	40	0–1	0 баллов – 30 %; 1 балл – 70 %
СОД 30 Гр + Амифостин	40	0–1	0 баллов – 35 %; 1 балл – 65 %
АК	20	0	100 %
Амифостин	20	0	100 %

Биохимический анализ крови

Биохимическое исследование крови животных, фракционно облученных электронами в СОД 30 Гр, на 7-е сутки демонстрировало повышение уровней АЛТ (в 2,4 раза), АСТ (на 20,9 %), щелочной фосфатазы (в 2,8 раза) и общего билирубина (на 60,2 %) по сравнению с контрольной группой. В течение эксперимента в этой группе отмечали тенденцию к неуклонному увеличению изучаемых показателей, а к окончанию эксперимента (90-е сутки) уровень АЛТ был повышен в 3,49 раза, АСТ – на 38,3 %, щелочной фосфатазы – в 3,4 раза, общего билирубина – на 88,4 %, по сравнению с контролем. Следует отметить, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина в те же сроки демонстрировало значения, близкие к контрольной группе, без

значительной тенденции к их увеличению. При этом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты оказалось более эффективным.

Оценка маркеров редокс-системы

В гомогенизированной ткани печени при помощи анализа ELISA через неделю после облучения электронами СОД 30 Гр отмечали увеличение уровня MDA в 2,4 раза и снижение уровня SOD в 2,6 раза по сравнению с контролем. В течение эксперимента наблюдали тенденцию к незначительному восстановлению баланса этих маркеров. Менее выраженные изменения выявлены в группе предлучевого введения АК: увеличение MDA в 1,6 раза и снижение SOD в 1,4 раза по сравнению с результатами контрольной группы. На 90-е сутки показатели всех опытных групп, за исключением II группы, не отличались от контрольных значений. Причем предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к более быстрому восстановлению этих показателей до контрольных значений по сравнению с амифостином.

Гистологическая и морфометрическая характеристика

В контрольной группе отмечали нормальное строение печени. Оценка по шкале МИП – 0 баллов. Аналогичную морфологическую картину наблюдали в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронами (V-я и VI-я группы). При гистологическом исследовании во II группе уже через неделю в печени наблюдали мелкие кисты; вакуолизацию цитоплазмы и пикноз ядер гепатоцитов; фокальную атрофию 1/3 – 2/3 части печеночных долек; умеренный частичный некроз (менее 50% окружности большинства портальных трактов); клеточную воспалительную инфильтрацию 1/3 – 2/3 части портальных трактов. Оценка по шкале МИП – 9 баллов. При морфометрическом анализе печени в этой группе обнаружили резкое снижение объемной плотности (уменьшение количества гепатоцитов на единицу объема) и диаметра гепатоцитов, что сопровождалось расширением диаметра центральной вены (в 4,3 раз) и гиперплазией клеток Купфера по сравнению с контрольными значениями. Обнаруженные изменения сохранялись на протяжении всего эксперимента вплоть до третьего месяца, когда наблюдали умеренное разрастание волокнистого компонента, фокальную атрофию 1/6 части печеночных долек, единичные мононуклеарные воспалительные клетки. Местами отмечали расширение синусоидов, утолщение стенки желчных протоков. Данные изменения были определены как признаки развивающегося радиационно-индуцированного фиброза печени. Менее значимые изменения морфометрических параметров отмечены в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина. В печени животных III-ей группы наблюдали: фокальную атрофию и вакуолизацию цитоплазмы некоторых гепатоцитов (менее чем в 1/3 части печеночных долек), воспалительный инфильтрат занимал менее 1/3 части портальных трактов, фиброз отсутствовал (по шкале МИП, в среднем, 4 балла). При морфометрическом анализе отмечали менее выраженное снижение объемной плотности и диаметра гепатоцитов, а также

незначительное увеличение диаметра центральной вены (в 2,3 раз) и количества клеток Купфера по сравнению с контрольными значениями и показателями группы локального облучения электронами. Практически аналогичный морфологический паттерн наблюдали в группе предлучевого введения амифостина (Таблица 2, Рисунок 3).

Таблица 2 – Оценка по Шкале морфологических изменений печени (МИП)

	Некроз	Дистрофия/ Атрофия	Инфильтрация портальных трактов	Фиброз		1 нед	3 мес
				1 нед	3 мес		
Контроль	0	0	0	0	0	0	0
СОД 30 Гр	3	3	3	0	1	9	10
СОД 30 Гр + АК	3	1	1	0	0	4	2
СОД 30 Гр + АМ	3	1	1	0	0	4	2
АК	0	0	0	0	0	0	0
Амифостин	0	0	0	0	0	0	0

Таким образом, в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина на протяжении всего эксперимента отмечали выраженную тенденцию к восстановлению исследуемых показателей, что подтверждено результатами гистологического и морфометрического исследований, а на третьем месяце в этих группах практически не обнаружили разрастания волокнистого компонента печени, а фокальную атрофию гепатоцитов обнаруживали лишь в единичных образцах; воспалительные клетки отсутствовали. Однако, следует отметить, что данные показатели уже на втором месяце эксперимента были практически равны контрольным значениям при использовании аскорбиновой кислоты, в то время как восстановление гистоархитектоники печени при введении амифостина занимало более длительное время.

Иммуногистохимическое исследование

При проведении иммуногистохимических реакций с антителами к фактору пролиферации Ki-67 в печени животных контрольной группы на всех сроках эксперимента, в среднем, отмечали окрашивание единичных гепатоцитов ($5,2 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$), а также некоторых непаренхиматозных клеток (клеток фибробластического ряда, эндотелиоцитов и др.). Практически аналогичные значения наблюдали в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронами (группы V и VI). Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к резкому снижению количества окрашенных гепатоцитов в 2,0 раза ($2,6 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями без значимой тенденции к восстановлению в течение всего эксперимента. Данный иммуногистохимический паттерн сохранялся на всех сроках эксперимента без значимой тенденции к восстановлению

пролиферативной активности гепатоцитов и непаренхиматозных клеток. В тоже время, в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты также отмечали снижение доли Ki-67-позитивных гепатоцитов на ранних сроках, а их количество было ниже контрольных значений в 1,6 раза ($3,3 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$). Одним из наиболее наглядных маркеров апоптотической клеточной смерти является фактор терминации апоптоза, общий для внутреннего и внешнего пути – каспаза 3. В контрольной группе на всех сроках эксперимента наблюдали лишь единичные окрашенные гепатоциты ($6,4 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$) и некоторые непаренхиматозные клетки (клетки фибробластического ряда, эндотелиоциты и др.). Аналогичные значения были получены на всех сроках эксперимента при проведении ИГХ-реакций с антителами к каспазе 3 в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронами. Локальное облучение печени электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к нарушению пролиферативно-апоптотического соотношения и резкому увеличению активности апоптотического каскада, обнаруженному по увеличению уровня экспрессии каспазы 3 в гепатоцитах более чем в 1,9 раза ($12,5 \pm 0,6\%$; $p < 0,05$) по сравнению с контрольными показателями. При этом, также отмечали незначимое увеличение окрашивания некоторых непаренхиматозных клеток, таких как фибробласты, эндотелиальные клетки синусоидных капилляров и кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров. На более поздних сроках, была выявлена тенденция к незначительному снижению доли каспаза-3-позитивных гепатоцитов, их количество на третьем месяце эксперимента превышало контрольные значения более чем в 1,6 раза ($10,6 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$). Через неделю после предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина отмечали преходящее незначительное повышение уровней экспрессии каспазы 3 – в 1,2 раза ($10,3 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$) и в 1,1 раза ($10,7 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$) по сравнению с группой монооблучения, соответственно. В обеих группах отмечали позитивную тенденцию к снижению данного показателя, причем аскорбиновая кислота индуцировала его более раннее возвращение к нормальным значениям (на втором месяце) по сравнению с группой предлучевого введения амифостина (Рисунок 1).

TUNEL-исследование

Для выявления и подсчета локусов фрагментации (одно- или двуцепочечных разрывов) ДНК в гепатоцитах использовали метод TUNEL в поле зрения флуоресцентного микроскопа. Количество гепатоцитов с участками ДНК, окрашенными флуорохромом, в контрольной группе не превышало отметки в 3 % на протяжении всего эксперимента. Аналогичные данные были получены в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без дальнейшего воздействия локального облучения электронами. Напротив, у животных, локально облученных электронами в суммарной дозе 30 Гр, отмечали резкое увеличение количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК до 72% на первой неделе эксперимента. Тем не менее, несмотря на

тенденцию к частичной репарации повреждений ДНК и снижению доли TUNEL-позитивных гепатоцитов в этой группе в течение эксперимента, доля окрашенных клеток даже на третьем месяце составляла 15 %, что превышает контрольные значения более чем в 10,0 раз. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты (III группа) и амифостина (IV группа) уже на 7 сутки демонстрировало снижение числа разрывов ДНК в гепатоцитах, что подтверждено более низкими значениями количества TUNEL-позитивных локусов (в 8,0 раза и в 7,6 раза, соответственно) по сравнению с группой облучения электронами СОД 30 Гр ($p < 0,05$). В этих группах так же отмечали тенденцию к снижению доли поврежденных локусов ДНК, причем в течение первых двух месяцев темпы восстановления в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты значительно превышали таковые для амифостина ($p < 0,05$). Однако, к третьему месяцу эксперимента в обеих группах отметили практически полное восстановление TUNEL-сигналинга в гепатоцитах до контрольного уровня (Рисунок 3).

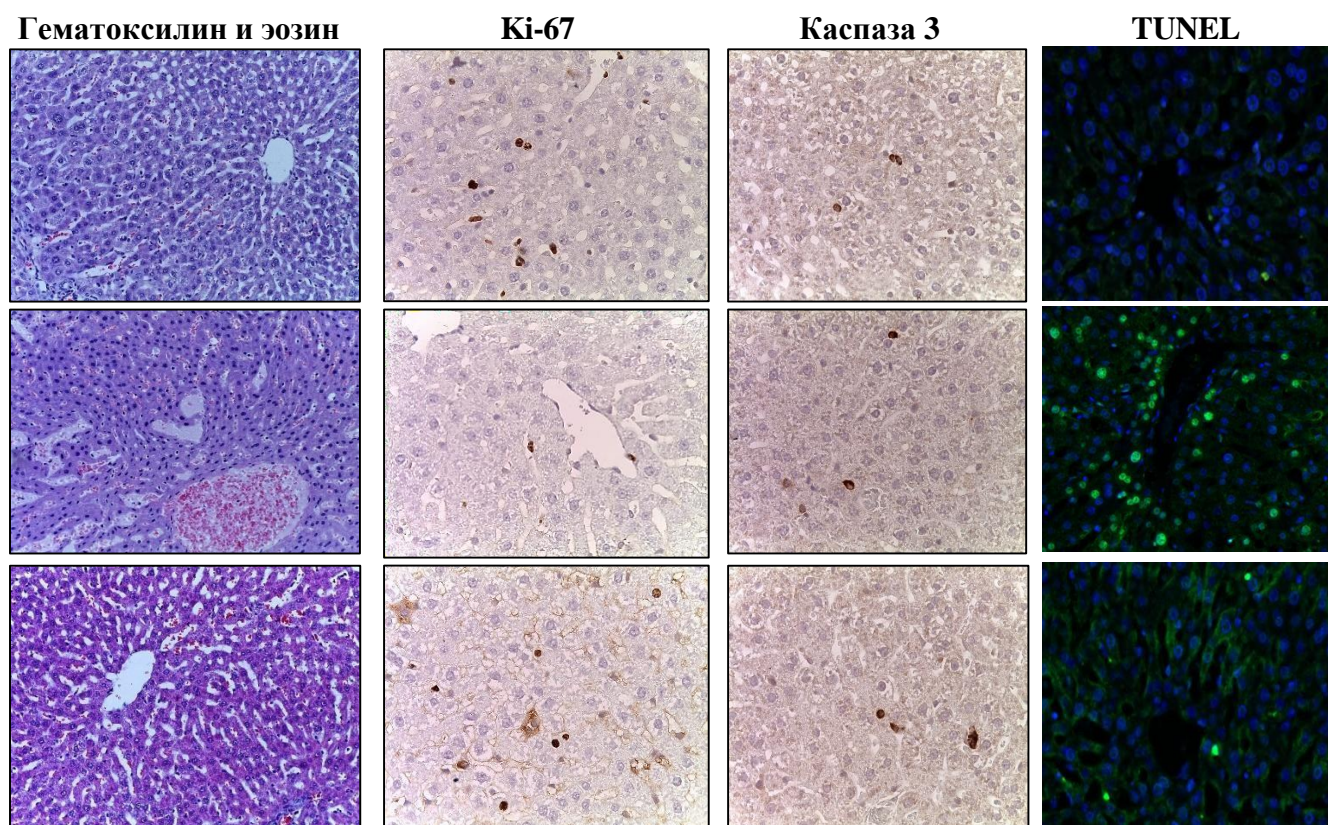


Рисунок 1 – Фрагмент печени на 7 сутки. Группы, ряд: верхний – контроль, средний – СОД 30 Гр, нижний – СОД 30 Гр + АК. Увеличения: окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$; иммуногистохимические реакции, $\times 400$

Молекулярно-генетический анализ регуляторов жизненного цикла клеток печени

Оценку влияния локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина на уровни экспрессии генов-регуляторов жизненного цикла клеток печени *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase 3* проводили при помощи количественной ПЦР в реальном времени. На 7-е сутки в группе локального облучения

электронами в суммарной дозе 30 Гр отмечали существенное преобладание экспрессии мРНК *Bax* по сравнению с контрольной группой, что указывает на активацию проапоптотических каскадов. Экспрессия антиапоптотического *Bcl-2* в этой группе незначительно превышала контрольные значения, что не соответствовало уровням *Bax*. Это привело к увеличению соотношения *Bax/Bcl-2*, что предполагает запуск механизмов выхода клеток печени в апоптоз и их апоптотическую гибель. Напротив, предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина демонстрировало умеренный ответ исследуемых показателей на локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр. Несмотря на незначительное повышение уровней экспрессии *Bax* и *Bcl-2* по сравнению с контрольной группой, в группе локального облучения электронами СОД 30 Гр отмечено существенное снижение вариативности данных параметров. В этих группах на всех сроках эксперимента сохранялось устойчивое соотношение *Bax/Bcl-2*. Кроме того, для количественной оценки активации генов, ответственных за апоптотическую гибель клеток печени, была проведена молекулярно-генетическая оценка экспрессии мРНК фактора терминации апоптоза каспазы 3. Уровни этого параметра в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр значительно превышали контрольные показатели. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина с целью радиопротекции клеток печени в равной степени привело к менее выраженной активации гена *Caspase 3* по сравнению с группой облучения, различий по степени и срокам приближения показателей групп аскорбиновой кислоты и амифостина к контрольным значениям не обнаружили. На поздних сроках эксперимента (60-е и 90-е сутки) уровни экспрессии исследуемых генов значимо не отличались от контрольных значений. В группах, которым вводили аскорбиновую кислоту или амифостин без дальнейшего воздействия локального облучения электронами на всех сроках эксперимента отмечали показатели экспрессии исследуемых маркеров, аналогичные таковым в контрольной группе.

Анализ воспалительной реакции

С целью оценки выраженности воспалительной реакции был проведен количественный иммуноферментный анализ сыворотки крови методом ELISA на основные провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, TNF- α) и противовоспалительный цитокин ИЛ-10 с определением их соотношения. Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр на 7-е сутки привело к резкому увеличению концентраций провоспалительных цитокинов по сравнению с контрольной группой: ИЛ-1 β – в 6,2 раза, ИЛ-6 – в 3,1 раза, TNF- α – в 6,8 раза ($p < 0,05$). В то же время, обнаруженный прирост концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10 был менее выражен и превышал контрольные значения в 5,2 раза ($p < 0,05$). На более поздних сроках

концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови практически не отличались от контрольных значений. В группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр уже на 7-е сутки обнаружили частичную протекцию цитокинового баланса при менее выраженном повышении уровней исследуемых цитокинов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$): ИЛ-1 β – в 5,1 раза, ИЛ-6 – в 2,6 раза, TNF- α – в 5,3 раза, ИЛ-10 – в 4,7 раза. На более поздних сроках концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови групп предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также групп введения этих препаратов без воздействия облучения статистически значимо не отличались от контрольных значений. Количественная оценка экспрессии цитокинов в гомогенате печени этой группы методом ELISA на 7-е сутки подтвердила увеличение локальной концентрации цитокинов с преобладанием провоспалительных над противовоспалительными. Так, в гомогенизированной ткани печени было обнаружено повышение концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-10 по сравнению с контрольными значениями в 5,0 раза, в 4,5 раза и в 3,7 раза, соответственно ($p < 0,05$). На поздних сроках отмечали некоторое снижение концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а на третьем месяце их количество по-прежнему значительно превышало контрольные показатели ($p < 0,05$): ИЛ-1 β – в 4,6 раза, ИЛ-6 – в 3,4 раза, ИЛ-10 – в 4,0 раза. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к частичному предотвращению развития локальной воспалительной реакции в результате снижения экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Это было подтверждено результатами количественной оценки их концентраций в гомогенизированной ткани: на первой неделе эксперимента значения экспрессии ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-10 при проведении анализа ELISA оказались ниже на 50 %, на 33 % и на 7 % по сравнению с группой облучения электронами в суммарной дозе, соответственно ($p < 0,05$). Следует отметить практически полное сохранение баланса провоспалительных/противовоспалительных цитокинов в этой группе. На более поздних сроках положительная динамика сохранялась, а экспрессия исследуемых маркеров на третьем месяце практически приближалась к контрольным показателям. Примечательно, что, несмотря на аналогичную позитивную динамику и тенденцию к восстановлению цитокинового состава до контрольных значений, в группе предлучевого введения амифостина в течение эксперимента в некоторых случаях отмечали более высокие уровни экспрессии отдельных цитокинов по сравнению с группой предлучевого введения аскорбиновой кислоты. Так, на последнем месяце обнаружили статистически значимо повышенные значения концентрации ИЛ-6 (на 12 %, $p < 0,05$) при сравнении эффективности амифостина и аскорбиновой кислоты.

Гистохимическое исследование

С целью оценки степени разрастания волокон соединительной ткани при предлучевом введении аскорбиновой кислоты или амифостина, а также для подтверждения использования коэкспрессии α -SMA и TGF- β в звездчатых клетках печени в качестве ранних маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени, было проведено гистохимическое окрашивание микропрепаратов трихромом по Массону на 3 месяце эксперимента. Так, спустя три месяца после воздействия локального облучения электронами СОД 30 Гр обнаружили умеренное разрастание стромального компонента печени, количественно подтвержденное увеличением площади окрашивания коллагеновых волокон анилиновым синим и хромогенности по результатам морфометрической обработки полученных изображений. Выявленные изменения локализовались преимущественно в перисинусоидном и междольковом пространствах печени. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина привело к частичному предотвращению развития радиационно-индуцированного фиброза печени, ожидаемому нами на основании анализа коэкспрессии α -SMA и TGF- β на ранних сроках. Так, к третьему месяцу в этих группах обнаружили снижение оптической плотности коллагеновых волокон по сравнению с II группой. Площадь коллагеновых и ретикулярных волокон по данным гистохимического исследования трихромом по Массону на этом сроке была приближена к контрольным значениям. Слабое диффузное окрашивание волокнистого компонента соединительной ткани анилиновым синим отмечали лишь в некоторых локусах перисинусоидного и / или междолькового пространств. Гистохимическая картина, которую наблюдали в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина, а также морфометрические показатели хромогенности коллагеновых волокон были аналогичны таковым в контрольной группе (Рисунок 2).

Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование на выявление маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени

На основании данных специализированной научной литературы и собственных наблюдений, в качестве потенциальных ранних маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени в настоящей работе были апробированы α -актин гладких мышечных клеток (α -SMA) и трансформирующий фактор роста- β (TGF- β). При этом особое внимание уделяли маркированию клеток Ито, которые, кроме накопления витамина А в липидных каплях, в том числе участвуют в регуляции коллагенообразования экстрацеллюлярного матрикса. По результатам флуоресцентной микроскопии печени с антителами к потенциальным маркерам фиброгенеза (α -SMA и TGF- β) на 7 сутки после воздействия электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр отмечали усиление сигналинга в клетках Ито, в отличие от образцов контрольной группы. Иммунофлуоресцентная метка на профибротический фактор TGF- β также была зафиксирована в гепатоцитах. Напротив,

ослабление сигналинга на указанные маркеры отмечали в звездчатых клетках печени в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед локальным облучением электронами в СОД 30 Гр. В группе предлучевого введения амифостина интенсивность сигнала α -SMA и TGF- β в звездчатых клетках печени была незначительно выше, чем при предлучевом введении аскорбиновой кислоты. Коэкспрессия α -SMA и TGF- β в печени групп, которым вводили аскорбиновую кислоту или амифостин без дальнейшего воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, практически отсутствовала (Рисунок 2).

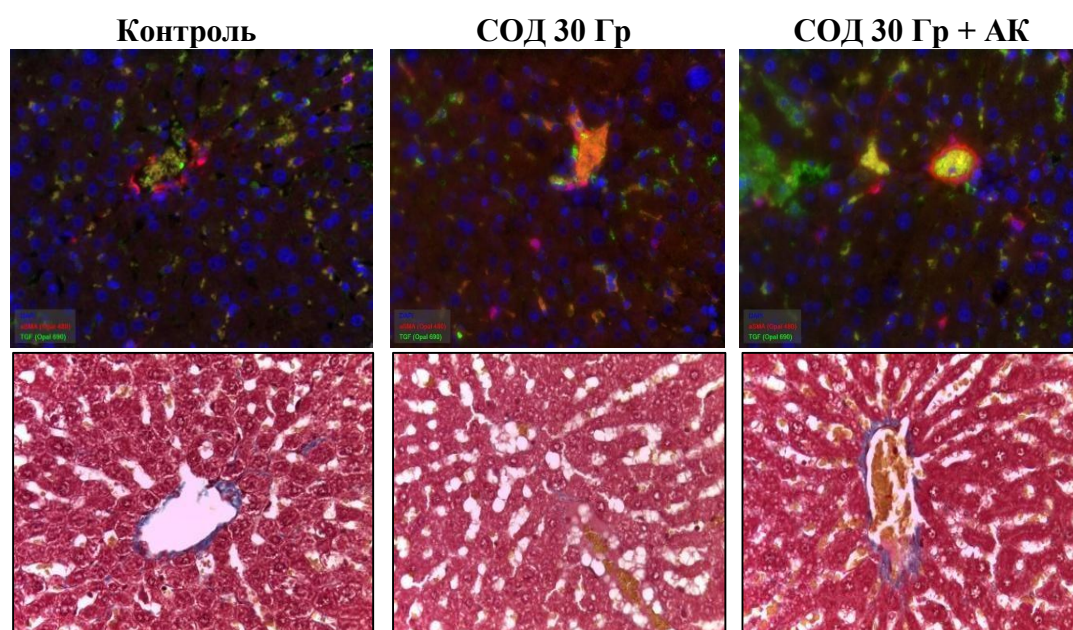


Рисунок 2 – Фрагмент печени; увелич. $\times 400$. Верхний ряд – иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование методом флуоресцентной микроскопии с антителами к маркерам-предикторам фиброгенеза α -SMA (Oral 480) и TGF- β (Oral 690), на 7 сутки. Красное (α -SMA) и зеленое (TGF- β) флуоресцентное окрашивание в звездчатых клетках печени, а также синее свечение – DAPI – ядра. Нижний ряд – гистохимические реакции трихромом по Массону на 90 сутках

Таким образом, в исследовании проведена комплексная оценка радиационно-индуцированного повреждения печени после локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, включая описание молекулярно-биологических механизмов патогенеза ранних и отсроченных осложнений. Воздействие электронами приводит к развитию схожих с рентгеновским и гамма-излучением биохимических и гистологических изменений, но со значительно меньшим риском для окружающих тканей, непопадающих непосредственно в зону облучения. Предлучевое использование аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора привело к снижению степени оксидативного стресса путем связывания и утилизации свободнокислых радикалов, а также индукции эндогенной антиоксидантной защиты и восстановления редокс-гомеостаза. Это способствовало протекции гепатоцитов,

предотвращению их апоптотической гибели, а также развития воспалительной реакции в печени как на раннем периоде радиационно-индуцированной болезни печени, так и в отношении отсроченных осложнений, таких как фиброз печени. Это объясняется предотвращением активации звездчатых клеток печени (оцененной по уровню α -SMA) и снижением экспрессии профиброгенного TGF- β . Коэкспрессия этих маркеров определяется уже на первом месяце после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, что может использоваться в качестве раннего маркера-предиктора развития радиационно-индуцированного фиброза печени у пациентов, проходящих радиотерапию по поводу злокачественных новообразований печени и/или органов брюшной полости.

ВЫВОДЫ

1. Локальное воздействие электронов на печень в режиме фракционирования в СОД 30 Гр через неделю приводит к баллонной дистрофии большинства гепатоцитов (вакуолизации цитоплазмы, пикнозу ядер), фокальной атрофии 1/3 – 2/3 части печеночных долек, частичному некрозу (менее 50% окружности большинства портальных трактов), клеточной воспалительной инфильтрации 1/3 – 2/3 части портальных трактов, расширению и застойным явлениям в синусоидных гемокапиллярах; оценка по шкале МИП – 9 баллов (контроль – 0 баллов). Степень выраженности морфологических изменений структур печени к 3 месяцу снижается, аналогично группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты, но уже в начале эксперимента.

2. Фракционное воздействие электронами СОД 30 Гр характеризуется прогрессированием печеночной недостаточности в течение всего времени наблюдения: повышением концентрации АЛТ – $105,2 \pm 5,3$ ЕД/л, АСТ – $202,1 \pm 9,7$ ЕД/л, ЩФ – $84 \pm 4,12$ ЕД/л, признаки которой нивелируются предлучевым введением препаратов-протекторов – аскорбиновой кислоты и аминокфостина.

3. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к изменениям маркеров редокс-системы на 7 сутки: повышению уровня малонового диальдегида ($9,2 \pm 1,7$ ЕД/мг белка, $p < 0,05$) и снижению уровня супероксиддисмутазы ($23,3 \pm 4,4$ нмоль/мг белка, $p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями, с последующим восстановлением к 3 месяцу. Аскорбиновая кислота способна усиливать систему естественной эндогенной антиоксидативной защиты, сопровождающееся незначительными отклонениями уровней малонового диальдегида и супероксиддисмутазы ($7,0 \pm 1,4$ ЕД/мг белка, $p < 0,05$ и $45,2 \pm 7,2$ нмоль/мг белка, $p < 0,05$ соответственно).

4. Локальное воздействие электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр приводит к снижению уровня экспрессии маркера пролиферации – Ki-67- ($2,6 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$) и увеличению степени экспрессии фактора терминальной стадии апоптоза – каспаза-3- ($12,5 \pm 0,6\%$,

$p < 0,05$) в гепатоцитах на 7 сутки без значимой тенденции к восстановлению в течение всего срока наблюдения, по сравнению с показателями контрольной группы. Также в данной группе отмечается существенное увеличение экспрессии мРНК *Bax/Bcl-2* ($Bax - 2,9 \pm 0,14 / Bcl - 1,75 \pm 0,085$) в пользу первого, что предполагает запуск механизмов выхода гепатоцитов в апоптоз. При предлучевом введении аскорбиновой кислоты на 1 месяце также отмечается снижение пролиферативно-апоптотического баланса гепатоцитов: Ki-67 – $3,3 \pm 0,1\%$, $p < 0,05$; каспаза-3 – $10,3 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$. Однако, к концу эксперимента наблюдается полное восстановление уровня экспрессии Ki-67 и каспазы-3 к контрольным значениям. Аналогичная картина визуализируется при количественной оценке генов-регуляторов клеточного цикла – *Bax* и *Bcl-2* – на 7 сутки: отмечается увеличение экспрессии мРНК *Bax* ($2 \pm 0,097$) и *Bcl-2* ($1,55 \pm 0,075$) с последующим возвращением данных показателей к исходным значениям на третьем месяце.

5. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к резкому увеличению количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК при TUNEL-исследовании на 1 месяце – до 72% (контроль – до 1,5%), а на 3 месяце – 15%. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты уже на первой неделе демонстрирует более низкие значения TUNEL-позитивных локусов – до 9,5%. К концу эксперимента отмечено полное восстановление TUNEL-сигналинга до контрольного уровня.

6. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к повышению концентрации цитокинов в сыворотке: ИЛ-1b – $89,2 \pm 4,3$ пг/мл ($17,3 \pm 0,8$ пг/мл); ИЛ-6 – $60,0 \pm 2,9$ пг/мл ($21,1 \pm 1,1$ пг/мл); TNF- α – $109,3 \pm 5,1$ пг/мл ($19,7 \pm 0,9$ пг/мл); ИЛ-10 – $39,2 \pm 1,9$ пг/мл ($4,4 \pm 0,2$ пг/мл) с последующим восстановлением данных показателей к третьему месяцу. Аскорбиновая кислота обеспечивает частичную протекцию цитокинового баланса при менее выраженном повышении уровней исследуемых цитокинов уже на 7 сутки по сравнению с группой монооблучения ($p < 0,05$): ИЛ-1b – $72,1 \pm 3,4$ пг/мл; ИЛ-6 – $57,4 \pm 2,6$ пг/мл; TNF- α – $95,6 \pm 4,6$ пг/мл; ИЛ-10 – $28,9 \pm 1,4$ пг/мл. На более поздних сроках концентрации данных цитокинов в сыворотке исследуемых групп статистически значимо не отличались от контрольных показателей.

7. При исследовании гомогената печени выявили повышение уровней экспрессии ключевых цитокинов после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр: ИЛ-1b – $376,6 \pm 17,7$ пг/мл, $p < 0,05$ ($82,3 \pm 3,8$ пг/мл, $p < 0,05$), ИЛ-6 – $168,3 \pm 8,1$ пг/мл, $p < 0,05$ ($52,4 \pm 2,4$ пг/мл, $p < 0,05$), ИЛ-10 – $188,7 \pm 9,1$ пг/мл, $p < 0,05$ ($49,1 \pm 2,4$ пг/мл, $p < 0,05$). При этом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты обеспечивает баланс уровней провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов уже в раннем периоде: ИЛ-1 – $156,3 \pm 7,97$ пг/мл, $p < 0,05$, ИЛ-6 – $93,4 \pm 4,52$ пг/мл, $p < 0,05$, ИЛ-10 – $102,6 \pm 5,04$ пг/мл, $p < 0,05$.

8. В ответ на локальное фракционное облучение печени электронами в СОД 30 Гр происходит прогрессирующее разрастание волокнистого компонента (хромогенность трихромом по Массону – 2,7 балла, по сравнению с контрольным значением – 0,9 балла) – начальные признаки развивающегося радиационно-индуцированного фиброза. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует снижению степени выраженности фиброзирования.

9. Коэкспрессия α -SMA и TGF- β в клетках Ито активирует механизмы развития радиационно-индуцированного фиброза печени после воздействия электронов в режиме фракционирования в СОД 30 Гр, который особенно выражен к 3 месяцу. Флуоресцентный сигналинг снижен в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В радиобиологической, онкологической и гепатологической практике при назначении электронотерапии печени и органов брюшной полости следует учитывать дозозависимое развитие радиационно-индуцированного поражения, возможную обратимость процесса. В работе врача-радиотерапевта и онколога рекомендовано применять меры профилактики печеночной недостаточности и развития фиброза, применением аскорбиновой кислоты – как предиктора. Степень выраженности морфологических изменений структур печени в условиях радиационно-индуцированного поражения, вызванного электронотерапией, необходимо учитывать при проведении доклинических исследований и в практике врача-патологоанатома.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Характеристика пролиферации и апоптоза гепатоцитов после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Демяшкин Г.А., Атяшкин Д.А., **Якименко В.А.**, Вадюхин М.А., Абуев А.А., Угурчиева Д.И. // **Морфология**. – 2023. – Т. 161, № 3. – С. 31-38 [RCSI]

2. Характеристика стромального компонента печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Демяшкин Г.А., **Якименко В.А.**, Вадюхин М.А., Угурчиева Д.И., Корякин С.Н. // **Биомедицина**. – 2024. – Т. 20, № 4. – С. 70-77 [RCSI]

3. Морфофункциональная характеристика печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Демяшкин Г.А., **Якименко В.А.**, Вадюхин М.А., Китиева А.А., Васильева Н.В. // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета**. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 134-140. [RCSI]

4. Оценка воспалительной реакции после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, **В. А. Якименко**, М. А. Вадюхин, Д. И. Угурчиева // **Ульяновский медико-биологический журнал**. – 2024. – № 3. – С. 98-106.

5. Demyashkin, G.; Parshenkov, M.; Koryakin, S.; Skovorodko, P.; Shchekin, V.; **Yakimenko, V.**; Uruskhanova, Z.; Ugurchieva, D.; Pugacheva, E.; Ivanov, S.; et al. Targeting oxidative stress: the potential of Vitamin C in protecting against liver damage after electron beam therapy. **Biomedicines** - 2024, 12, 2195. [Scopus]

6. Потенциал аскорбиновой кислоты в протекции острого лучевого повреждения / Паршенков М.А., Урусханова Ж.Э., **Якименко В.А.**, Угурчиева Д.И., Муртазалиева З.М., Екатерина Н.П. // VII Международный форум онкологии и радиотерапии «Ради жизни», сборник материалов. Москва, 2024: С. 38.

7. Пролиферация и апоптоз гепатоцитов крыс после локального облучения электронами / **В. А. Якименко**, Д. И. Угурчиева, М. А. Вадюхин, Г. А. Демяшкин // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 143-144.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АМ – амифостин

АСТ – аспаратаминотрансфераза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучение

ИЛ – интерлейкин,

ЛТ – лучевая терапия

ОБ – общий билирубин

п. зр. св. микр. – в поле зрения светового микроскопа

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОД – суммарная очаговая доза

ЩФ – щелочная фосфатаза

MDA – малоновый диальдегид МДА (анг. malondialdehyde)

SOD – супероксиддисмутаза (англ. superoxide dismutase)